Zur Kenntnis der allmählichen Hydrolyse des Pferde-Oxyhämoglobins.

Inaugural-Dissertation

der

Hohen philosophischen Fakultät

der

Universität Leipzig

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Hugo Kirbach

aus **Desterro** (Brasilien).

Weida i. Th.
Druck von Thomas & Hubert
Spezialdruckerei für Dissertationen
1906.

Angenommen von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Sektion auf Grund der Gutachten der Herren

Beckmann und Hantzsch.

Leipzig, den 2. August 1906.

Der Procancellar.

Marx.

Herrn Fritz Homann

in Minden i. W.

in dankbarer Verehrung.

Disposition.

Einleitung: Über den Wert der allmählichen Eiweißspaltung.

Aufgabe: Entsteht aus dem kristallisierten Pferde-Oxyhämoglobin bei der allmählichen Hydrolyse ein Kyrin?

Hauptteil:

I. Darstellung des Ausgangsmaterials und des Kyrinsulfaltes.

II. Reinigung, Eigenschaften und Zusammensetzung des Kyrinsulfates.

III. Spaltungen des Kyrins.

A. Qualitative Spaltung.

B. Quantitative Spaltung.

Die Verteilung des Stickstoffes auf Basen und Amidosäuren.

Die Bestimmung des Korrektionswertes.

Die Verteilung des Stickstoffes auf die einzelnen Basen.

IV. Diskussion über die Zusammensetzung des Kyrins.

Schluß: Zusammenfassung der Resultate und der Gründe, warum das isolierte Kyrin als ein einheitlicher Körper anzusehen ist.

Zur Aufklärung der Konstitution des Eiweißes sind vorwiegend Spaltungsversuche ausgeführt worden, bei denen durch tief eingreifende Reaktionen, wie durch die Einwirkung von siedender starker Salzsäure, ein Zerfall des Eiweißmoleküles in die sogenannten letzten Spaltungsprodukte, Amidosäuren etc., bewirkt wird. Hingegen liefert eine allmähliche Hydrolyse nicht sofort diese letzten Spaltungsprodukte, sondern größere Komplexe derselben, deren nähere Untersuchung einen Einblick in die Verkettung der kleinen, bei der vollständigen Hydrolyse auftretenden Gruppen zu gewähren verspricht. Die in dieser Richtung von Siegfried unternommenen Versuche, der das Glutin und das Kasein der allmählichen Hydrolyse unterwarf, haben ergeben, daß sowohl im Glutin[1]) als auch in Kasein[2]) die bei der vollständigen Hydrolyse als Arginin, Lysin und Glutaminsäure auftretenden Spaltungsprodukte der betreffenden Proteinkörper wenigstens zu einem wesentlichen Teile in einem Komplex von ausgesprochenem basischen Charakter und von ganz besonderen Eigenschaften vereinigt sind. Beim Glutin enthält dieser Komplex auch noch Glykokoll.

Siegfried isolierte diesen basischen Komplex beim Glutin zuerst durch die Einwirkung von $12^1/_2\,\%$iger Salzsäure auf das mit Hilfe seiner Eisenmethode[3]) rein dargestellte Glutin-Trypsinpepton, dessen weitere Zersetzung er mit Hilfe des Drehungsvermögens der Zersetzungslösung kontrollierte, wo-

[1]) M. Siegfried, Zur Kenntnis der Hydrolyse des Eiweißes. Bericht der math.-phys. Klasse der Kgl. Sächs. Ges. der Wissensch. zu Leipzig.

[2]) M. Siegfried, Über Kaseinokyrin, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XLIII, S. 46 ff.

[3]) M. Siegfried, Ber. der deutschen chem. Gesellschaft **33**, 2851; Zeitschrift für physiol. Chemie XXXV, 187.

bei sich nach einer gewissen Zeit eine Abänderung der Linksdrehung nicht mehr zeigte, und dann direkt aus der Gelatine, indem er sie ebenso der Einwirkung von $12^1/_2\,\%$iger Salzsäure bei 38—40° aussetzte. Auf gleiche Weise zersetzte er direkt das Kasein. In allen 3 Fällen wurden die entstehenden basischen Komplexe aus der Zersetzungslösung mit Phosphor-Wolframsäure ausgefällt und in Sulfate übergeführt, die nach mehreren Umfällungen Konstanz ihrer Zusammensetzung zeigten; die beiden aus der Gelatine gewonnenen Körper stimmten unter sich vollständig überein. Die Konstanz der Zusammensetzung und die weitere Untersuchung der isolierten basischen Komplexe berechtigten Siegfried zu dem Schlusse, daß in ihnen einheitliche Körper von ganz besonderem Typus vorlägen. Er bezeichnete sie als die basischen Kerne des Glutins und des Kaseins und gab ihnen die Namen Glutokyrin und Kaseinokyrin. Sie zeigen im Gegensatz zu den Peptonen basischen Charakter und sind optisch inaktiv. Ihre Phosphorwolframate kristallisieren in gut ausgebildeten Kristallen.

Da aus der Existenz solcher basischen Komplexe oder Kyrine im Leim und Kasein noch nicht ohne weiteres geschlossen werden konnte, daß solche auch in anderen Proteinstoffen vorhanden sind, mußten Versuche gemacht werden, auch aus anderen Eiweißkörpern und zwar verschiedener Gruppen solche basische Komplexe oder Kyrine zu isolieren.

Aufgabe: Ich unterzog mich daher auf Veranlassung des Herrn Professor Dr. Siegfried der Aufgabe, festzustellen, ob auch die im Hämoglobin vorhandenen basischen Spaltungsprodukte in einem derartigen einheitlichen Komplex, einem Kyrin, zusammengeschlossen auftreten.

I. Darstellung des Ausgangsmaterials und des Roh-Globinokyrinsulfates.

Als Ausgangsmaterial wurde seiner leichten Kristallisationsfähigkeit wegen Pferdeoxyhämoglobin genommen; dasselbe wurde in 3 Darstellungen A, B und C, einmal im kleinen und zweimal im großen, gewonnen.

Darstellung A wurde für einen Vorversuch, Darstellung B für die Hauptuntersuchung, Darstellung C für eine Nachprüfung und Kontrolle verwendet.

Die roten Blutkörperchen des Pferdeblutes wurden nach Abheben des überstehenden Serums ohne vorheriges Auswaschen mit 0,8 %iger NaCl-Lösung (da sich nach meinen Erfahrungen die Blutkörperchen in dieser Lösung zu schlecht absetzen) mit 2 Volumen Wasser verrührt und dann mit Äther versetzt, wobei das Hämoglobin in Lösung ging. Darauf wurden bei Darstellung A nach der Vorschrift von Drechsel[1]) die Stromata bei strengem Vermeiden eines Überschusses mit Kaliumbisulfat gefällt, davon abfiltriert und die das Hämoglobin nun enthaltende, schön dunkelrote Lösung auf 0° abgekühlt, bei Darstellung B und C die ätherische Lösung sofort ohne Entfernung der Stromata auf diese Temperatur gebracht und dann in allen drei Fällen $^1/_4$ Vol. unter 0° abgekühlten Alkohols unter Umrühren zugesetzt. Die Lösung blieb einige

---

[1]) Drechsel, Anleitung zur Darstellung physiolog.-chem. Präparate, S. 21. Drechsel schreibt hier Natriumbisulfat vor; durch Kaliumbisulfat wird jedoch dasselbe erreicht.

Tage in öfters erneuerter Kältemischung stehen. Die danach abgeschiedenen Kristalle wurden nach Abgießen der Mutterlauge noch 2mal umkristallisiert, indem sie in Wasser von 35° gelöst und dann wie vorher aus der gekühlten Lösung durch kalten Alkohol wiederum ausgeschieden wurden. Das Nachwaschen geschah mit einer kalten Mischung von 1 Vol. Alkohol und 3 Vol. Wasser.

Das so dargestellte, reine, kristallisierte Pferdeoxyhämoglobin diente nun als Ausgangsmaterial für die in folgendem beschriebenen Versuche. Zunächst wurde es der allmählichen Zersetzung unterworfen.

Diese geschah mit der ca. 10fachen Menge $12^1/_2$ %iger Salzsäure während 10—12 Tagen bei 37—40°. Bei Darstellung A und B wurde der das Gemisch von Oxyhämoglobin und HCl enthaltende Kolben in Wasser von 37—40° gesetzt und des öfteren umgeschüttelt, bei Darstellung C dagegen der von M. Siegfried konstruierte Verdauungsapparat benutzt.

Beschreibung des Apparates:

Der Apparat besteht aus einem großen Kessel, in welchem Wasser auf 37—40° erwärmt wird. Mit Hilfe eines Ostwaldschen Thermostaten wird die Temperatur konstant erhalten. Im Kessel stehen 4 große, innen glasierte Töpfe, die mit Glasdeckeln zugedeckt werden können. Durch diese mit je 2 Tuben versehenen Glasdeckel reichen ein Thermometer und ein starker gläserner Rührer in das Innere der Töpfe und tauchen in die eventuell darin vorhandene Flüssigkeit. Die Rührer werden durch einen Elektromotor langsam gedreht, können höher und tiefer geschraubt und vermittels einer besonderen Einrichtung ausgehängt und damit außer Funktion gesetzt werden, sodaß sich immer nur der jeweilige in Gebrauch befindliche Rührer bewegt.

Der Apparat wurde Tag und Nacht in Betrieb gelassen. Durch das beständige Rühren wurde selbstverständlich eine intensivere Mischung des zu zersetzenden Hämoglobins mit

der Salzsäure ermöglicht, als beim zeitweiligen Schütteln und dadurch die Zersetzung beschleunigt.

Nach ca. 12tägiger Zersetzung wurde nun die ganze Zersetzungslösung von ungelöst gebliebenen Rückständen filtriert, diese gut ausgewaschen und das dunkel aussehende mit den Waschwässern vereinigte und dem gleichen Volumen Wasser verdünnte Filtrat unter kräftigem Rühren zuerst mit 10 %iger, dann mit 50 %iger Phosphor-Wolframsäurelösung versetzt; es fiel dadurch das rohe Kyrinphosphorwolframat als toniger Niederschlag aus. Die Phosphorwolframsäure wurde vor ihrer Verwendung ausgeäthert, da auch die als rein bezogene Säure selten frei von Verunreinigungen ist. Ihre Ausätherung geschah in der von Drechsel angegebenen Weise.[1])

Da sich das Roh-Kyrinphosphorwolframat im Überschusse der Säure wieder löst, wurde ein solcher vermieden. Das Phosphor-Wolframat setzte sich schnell und gut ab, sodaß die Mutterlauge leicht daraufhin geprüft werden konnte, ob alles ausgefällt war. Der Niederschlag wurde nun nach Abhebern der darüberstehenden Flüssigkeit, die die vom Kyrin abgespaltenen und durch Phosphor-Wolframsäure nicht fällbaren Bestandteile des Zersetzungsproduktes enthielt, und die nun hell geworden war, auf der Nutsche abgesaugt und gründlich bis zur Cl-Freiheit ausgewaschen. Er saugte sich gut ab und ging auch anfangs kaum durchs Filter. Das Auswaschen geschah mit 5 %iger Schwefelsäure, da in derselben das Kyrinphosphorwolframat, wenn auch immerhin etwas, so doch bei weitem nicht so löslich war als in 5 %iger H_2SO_4 + 5 %iger Phosphor-Wolframsäure oder Wasser. Es mußte ziemlich lange ausgewaschen werden, wodurch natürlich Verluste entstanden, aber die vollständige Beseitigung des Chlors war unerläßlich, da es sonst später auf keine Weise zu entfernen gewesen wäre.

Der Cl-freie Niederschlag wurde nun mit Wasser und Ammoniak unter Erwärmen bis zu 40° gelöst und mit Baryt-

[1]) Drechsel, Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. **20**, 1452.

hydrat unter möglichster Vermeidung eines zu großen Überschusses zersetzt. Vom Niederschlage wurde abfiltriert, mit Wasser gut ausgewaschen, das Filtrat von der geringen Menge überschüssigen Baryts durch Zusatz von Ammonkarbonat — dasselbe wurde auf Na-Freiheit geprüft — befreit und vom entstandenen Niederschlage wiederum filtriert. Die Lösung, die jetzt eine gelbe Färbung hatte, wurde nun auf dem Wasserbade bis zum dicken Sirup eingedampft. Dieser Sirup reagierte stark alkalisch — er enthielt das Rohkyrin.

Er wurde nun durch Zugabe von zuerst konzentrierter und dann verdünnter Schwefelsäure bis zur schwachen Bläuung von Kongopapier gelöst und so das Kyrinsulfat gebildet. Um dieses in festem Zustande zu erhalten, wurde zu der abfiltrierten schwefelsauren Lösung das gleiche Volumen absoluten Alkohols gegeben und nun gefällt, indem ich diese Lösung aus einem Tropftrichter in dünnem Strahle in absoluten Alkohol, der durch einen mechanisch bewegten Rührer kräftig umgerührt wurde, einfließen ließ. Auf ca. 20 ccm der schwefelsauren Lösung nahm ich 1 kg absoluten Alkohol. Das Sulfat fiel dabei schon beim ersten Male in schönen weißen Flocken aus, sodaß sich eine Entfärbung des Rohsirups durch wässerige Bleiacetatlösung wie beim Kaseinokyrin als nicht notwendig erwies.[1]) Das Sulfat setzte sich, wenn die zugeflossene Menge der Lösung der Quantität des Alkohols entsprach, auch sehr gut ab.

Nach dem Abhebern der Mutterlauge wurde nun abgesaugt, mit absolutem Alkohol bis zum Versagen der SO_4-Reaktion, dann mit Äther I ausgewaschen und das Sulfat schließlich im evakuierten Exsikkator unter häufigem Erneuern der Schwefelsäure bis zur vollständigen Entfernung des Äthers getrocknet. Zur weiteren Aufbewahrung des auf diese Weise ziemlich getrockneten Präparates genügte eine Glasbüchse mit eingeriebenem Stöpsel.

In bezug auf das Fällen und Absaugen muß noch folgendes bemerkt werden:

---

[1]) M. Siegfried, Über Kaseinokyrin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, S. 47.

Der Sirup durfte nicht in zu wenig Schwefelsäure gelöst werden, da das Sulfat dann nicht in weißen Flocken, sondern als gelbliches Pulver ausfiel. Wurde die Lösung dagegen zu verdünnt genommen, so wurden zu große Mengen Alkohols verbraucht.

Von Wichtigkeit war ferner die Verwendung der erforderlichen Menge Alkohol (1 kg auf ca. 20 ccm der schwefelsauren Lösung). Denn wurde die Lösung in zu wenig Alkohol verrührt, so verschmierte das Sulfat zu einer zähen, klebrigen Masse. Um dieses Verschmieren unter allen Umständen zu vermeiden, wurde darum sofort nach Absetzen des Niederschlages und Abhebern der Mutterlauge 1—2 kg frischer absoluter Alkohol zugegossen und dann erst auf der Nutsche abgesaugt. Diese mußte samt dem vorher mit Wasser festgesaugten Filter gut mit Alkohol abgespült bezw. ausgewaschen werden, da auch schon eine geringe Menge Wasser das Sulfat zu verschmieren und dadurch das Filter undurchlässig zu machen imstande ist.

Um die in der Mutterlauge noch ziemlich reichhaltig in Lösung befindliche Substanz nicht verloren gehen zu lassen, wurde der Alkohol verdampft, der zurückgebliebene Sirup wieder gelöst und nun in gleicher Weise wie vorhin gefällt. Freilich enthielt diese Fraktion auch einen Teil der in der Mutterlauge gebliebenen Verunreinigungen.

Ausbeute:

Darstellung A. Aus 6—7 l Pferdeblut wurde zweimal umkristallisiertes Oxyhämoglobin dargestellt; dasselbe wurde ohne vorheriges Trocknen 11 Tage lang mit 6 l $12^1/_2$ %iger Salzsäure im Kolben unter häufigem Schütteln zersetzt. Zur Ausfällung des Phosphorwolframates aus der Zersetzungslösung wurde gebraucht $^1/_2$ kg Phosphor-Wolframsäure, zur Ausfällung des festen Sulfates aus der schwefelsauren Lösung 5 l Alkohol. Ausbeute 30 g Roh-Kyrinsulfat.

Darstellung B. Aus 35 l Pferdeblut wurde 2 mal umkristallisiertes Oxyhämoglobin dargestellt und 12 Tage lang

mit 30 l $12^1/_2$ %iger HCl im Kolben unter häufigem Schütteln zersetzt. Verbrauch an Phosphor-Wolframsäure ca. 3 kg, an Alkohol 23 l. Ausbeute 200 g Roh-Kyrinsulfat.

Darstellung C. Aus 20 l Pferdeblut wurde 2 mal umkristallisiertes Oxyhämoglobin dargestellt und 10 Tage lang mit 18 l $12^1/_2$ %iger HCl im Verdauungsapparat zersetzt. Verbrauch an Phosphor-Wolframsäure ca. $1^3/_4$ kg, an Alkohol 16 l. Ausbeute ca. 119 g Roh-Kyrinsulfat.

II. Reinigung des Kyrins, Eigenschaften und Zusammensetzung desselben.

Es war nicht anzunehmen, daß das so erhaltene Roh-Kyrin schon rein war; es wurde daher des öfteren umgefällt, die einzelnen Präparate nach den Umfällungen analysiert und die Reinheit durch die Konstanz der einzelnen Zusammensetzungswerte, besonders des C- und des N-Wertes festgestellt. Das Umfällen wurde in doppelter Weise ausgeführt:

a) Das feste Sulfat wurde in wenig gemessenem Wasser gelöst und nun absoluter Alkohol unter Umschütteln in dünnem Strahle so lange zugesetzt, bis das Kyrin als Öl abgeschieden wurde und als zähe Substanz am Boden des Gefäßes klebte, was die 5—6 fache Menge Alkohol erforderte. Es wurde über Nacht stehen gelassen, der Alkohol abgegossen, nochmals in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt, am nächsten Tage abgegossen und nun erst wieder das Öl in 5%iger H_2SO_4 gelöst, mit dem gleichen Vol. Alkohol versetzt und diese Lösung wie beim Fällen des Rohsulfates in Alkohol verrührt. Auf diese Weise wurde also in Staffeln zu je 3 Stationen gereinigt.

b) das feste Sulfat wurde in 5%iger Schwefelsäure gelöst und sofort wieder als festes Sulfat gefällt. Diese Umfällung entsprach also immer der Station 3 einer jeden Staffel nach der unter a beschriebenen Reinigungsweise.

Ich habe zuletzt dieser zweiten Reinigungsweise den Vorzug gegeben, weil meinen Beobachtungen nach die Fällung als Öl eine Reinigung in geringerem Maße bewirkt; denn während ich bei hintereinander erfolgter 8 maliger Ölfällung und darauffolgender Fällung als festes Sulfat (also 9 Um-

fällungen) die C-Werte von 37,77% und 37,92% erhielt, bekam ich aus demselben Rohsulfate nach einmaliger Umfällung in das feste Sulfat die Werte 36,58% und 36,24%, die sich dem konstanten Werte schon um über 1% nähern. Außerdem gingen, wie die Analysentabelle auf S. 24 zeigt, die C-Werte bei der 2. Reinigungsmethode von Umfäliung zu Umfällung um rund 1% herunter; eine größere Differenz wurde durch die Staffelfällung, die doch einer 3 maligen Umfällung gleichkommen sollte, auch nicht erreicht. Dagegen sind hier die Verluste an Substanz, an Zeit und der Verbrauch an Alkohol größer gewesen.

Es mußte, wie die Analysentabelle auf S. 24 anzeigt, ziemlich oft umgefällt werden, ehe eine Konstanz der Werte eintrat, ehe also das Kyrin rein war. Die Verluste beim Umfällen waren ziemlich groß; sie betrugen 20—25% des jedesmal angewandten festen Sulfates; aber es kann ja wohl gerade deshalb aus der Konstanz der Fraktionen beweisend auf die Einheitlichkeit des Kyrins geschlossen werden. Des weiteren ging aus den Analysen hervor, daß das Sulfat von Anfang an nahezu aschefrei war. Die die Inkonstanz der Zusammensetzung der ersten Fraktionen bedingenden Verunreinigungen konnten also nicht anorganischer, sondern nur organischer Natur sein. Als besonders hartnäckige Verunreinigung erwies sich das Tyrosin. Bei Spaltung von 12 g des Sulfates der 15. Umfällung, bei welcher die Zusammensetzungswerte den konstanten Werten schon sehr nahe kommen, mit verdünnter Schwefelsäure wurde noch ziemlich 0,1 g Tyrosin abgeschieden; seine Identität wurde durch die Millonsche Reaktion und die Form seiner Kristalle nachgewiesen. Diese geringe Menge vermochte freilich die Analysenwerte nicht merkbar zu beeinflussen; seine reichliche Anwesenheit in den ersten Sulfatfällungen war aber jedenfalls neben der Anwesenheit anderer Verunreinigungen die Ursache dazu, daß die C-Werte so hoch und die N-Werte viel niedriger gefunden werden. Möglich ist auch, daß nicht Tyrosin selbst, sondern ein bei der Spaltung Tyrosin lieferndes Produkt die Verunreinigung bewirkte.

Auch die Konstanz der Verteilung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren N nach Spaltung des Kyrins mit Schwefelsäure wurde als Kriterium für die Reinheit des Sulfates genommen, wie die Tabelle auf S. 46 zeigt. Auch hier mag, neben anderen Verunreinigungen, hauptsächlich das Tyrosin die Ursache des geringer gefundenen Basen-Stickstoffes gewesen sein.

Im ganzen wurde bei dem aus Darstellung B gewonnenen Kyrinsulfat, mit dem die Hauptuntersuchungen ausgeführt wurden, 24 mal umgefällt (also 8 Staffeln). Darstellung C ergab schon nach 3 maligem direkten Umfällen in das feste Sulfat den konstanten C-Wert.

Eigenschaften:

Das Sulfat des aus dem Hämoglobin dargestellten Kyrins konnte in Kristallform nicht erhalten werden, ebensowenig wie die Sulfate des Gluto- und Kaseinokyrins. Aber auch beim Phosphorwolframat verliefen die Kristallisationsversuche resultatlos, während die Phosphorwolframate des Gluto- und Kaseinokyrins charakteristische Kristalle zeigten. Es wurden folgende Versuche gemacht:

Eine Lösung von 0,2 g des reinen Kyrinsulfates in Wasser wurde mit Natronlauge eben alkalisch gemacht und aus ihr ohne Gegenwart von Mineralsäuren mit Phosphorwolframsäure das Phosphorwolframat ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, gut mit Wasser ausgewaschen und dann in heißem Wasser gelöst. Von einem etwa ungelöst gebliebenen Rückstande wurde heiß abfiltriert. Beim langsamen Erkalten schied sich das Phosphorwolframat wieder aus; eine Probe davon, unter das Mikroskop gebracht, zeigte aber keine Kristalle, sondern nur regelmäßige Körnchen. Auch ein Zusatz von verdünnter Schwefelsäure zu dem gut ausgewaschenen, in Wasser suspendierten und darauf heiß gelösten Phosphorwolframate bewirkte keine Kristallbildung; es waren auch hier selbst nach mehrtägigem Stehenlassen nur Körnchen zu sehen. — Es ist möglich, daß die Anwesenheit des Histidin-Komplexes im Hämoglobinokyrin, der bei den bis jetzt dar-

gestellten Kyrinen fehlt, hier aber, wie später gezeigt werden wird, vorhanden ist, die Kristallbildung verhindert oder zum mindesten sehr erschwert. Arginin- und Lysinphosphorwolframat sind leicht in Kristallen zu erhalten, besonders letzteres, das schon beim gewöhnlichen Fällen in ziemlich großen, auch ohne Mikroskop sichtbaren Nadeln auskristallisiert. Anders verhält sich das Histidinphosphorwolframat. Eine kleine Quantität des später gewonnenen Histidindichlorids wurde in wenig Wasser gelöst, das Histidin mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, das Phosphorwolframat in heißem Wasser gelöst und durch Erkaltenlassen wieder abgeschieden. Eine Probe zeigte auch hier unter dem Mikroskope nur Körnchen; dagegen bewirkte der Zusatz von Schwefelsäure zu dem im Wasser suspendierten Phosphorwolframate, daß sich, wenn auch keine ausgesprochenen Kristalle, so doch immerhin zerfahrene Blättchen bildeten.

Das dargestellte Kyrinsulfat ist ebenso wie die freie Base leicht löslich in Wasser, dabei schaumbildend; es verschmiert leicht an der Luft und nimmt dann eine bräunliche Färbung an. Eine kleine Menge Substanz, in einem nicht dicht verschlossenen Büchschen aufbewahrt, verwandelte sich durch allmähliche Aufnahme von Wasser in einen zähen, braunen Sirup.

In Alkohol ist das Kyrin fast, in Äther vollständig unlöslich.

Es gibt deutlich die Biuretreaktion mit einem Stich ins Bordeauxrote, aber nicht die Millonsche Reaktion.

Das Sulfat gibt deutlich die Kongoreaktion.

Phosphorwolframsäure fällt auch aus dem Sulfate das Kyrin quantitativ aus.

Das Kyrin ist optisch inaktiv, trotzdem daß die einzelnen Spaltungsprodukte Aktivität zeigen; eine Kontrolle seiner Reinheit mit Hilfe der optischen Aktivität, wie sie bei den Pepsin- und Trypsinpeptonen angewendet wurde,[1]) konnte also nicht in Frage kommen.

---

[1]) Zeitschrift für physiol. Chemie **38**, 259 und **41**, 68.

Zusammensetzung des Kyrinsulfates.

Für die Analysen wurde das Kyrinsulfat bei ca. 95° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Es geschah dies in dem von Siegfried konstruierten, mit Rückflußkühler versehenen Trockenapparate,[1]) in welchem nach dem bekannten Prinzip die Temperatur konstant bleibt und immer mit H_2SO_4 getrocknete Luft über die Substanz geleitet wird. Das Sulfat wurde erst einen oder zwei Tage lang im Schiffchen über Schwefelsäure getrocknet, da es im Trockenapparate leicht schmilzt, wenn ihm noch zuviel Feuchtigkeit anhaftet. Die Substanz zeigte nach 3—4tägigem, täglich ungefähr 9stündigem Trocknen Konstanz. Die Gewichtsabnahme rührte nur zum allergeringsten Teile von einem Wasserverluste her; der größte Teil ist dem Verschwinden des Alkohols zuzuschreiben, den das über Schwefelsäure getrocknete Sulfat hartnäckig zurückhält.

Die Kohlen- und Wasserstoffbestimmungen wurden mit grobem CuO, reduziertem Cu und Bleichromat ausgeführt, die Stickstoffbestimmungen teils nach Kjeldahl, teils nach Dumas.

Es wurden meist Parallelbestimmungen ausgeführt.

Die Analysen ergaben folgende Werte:

Darstellung A: Die geringe Menge Substanz, die nach den Vorversuchen übrig blieb, gestattete keine Analysen.

Darstellung B: Das Rohkyrinsulfat wurde nicht analysiert. Ausbeute 200 g.

8malige Ölfällung und darauffolgende Fällung als festes Sulfat, also

9. Umfällung (I., II. und III. Staffel). Ausbeute 145 g.

C und H:

a) 0,1420 g Substanz ergaben 0,1962 g CO_2 und 0,0788 g H_2O
also C = 37,77%, H = 6,13%, Asche = 0,41%.

b) 0,1416 g Substanz ergaben 0,1969 g CO_2 und 0,0766 g H_2O
C = 37,92%, H = 6,00%, Asche = 0,46%.

---

[1]) Zeitschr. f. physiolog. Chemie **43**, 50.

N:

a) 0,1889 g Substanz erforderten 18,15 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 13,42 %.

b) 0,1988 g Substanz erforderten 18,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 13,24 %.

S:

0,1935 g Substanz ergaben 0,1423 g $BaSO_4$, S = 10,1 %.
0,1634 g Substanz ergaben 0,1202 g $BaSO_4$, S = 10,3 %.

12. Umfällung (nach 2 maliger Ölfällung, also IV. Staffel); Ausbeute 103 g.

C und H:

a) 0,1963 g Substanz ergaben 0,2592 g CO_2 und 0,1105 g H_2O
C = 36,02 %, H = 6,26 %, Asche = 0,27 %.

b) 0,2110 g Substanz ergaben 0,2797 g CO_2 und 0,1117 g H_2O
C = 36,15 %, H = 5,89 %, Aschefrei.

N:

a) 0,2065 g Substanz erforderten 20,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 13,8 %.

b) 0,1931 g Substanz erforderten 19,45 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 14,09 %.

S:

0,2075 g Substanz ergaben 0,1646 g $BaSO_4$, S = 10,89 %.

15. Umfällung (nach vorhergehender 2 maliger Ölfällung, also V. Staffel). Ausbeute 76 g.

C und H:

a) 0,1839 g Substanz ergaben 0,2382 g CO_2 und 0,0972 g H_2O
C = 35,34 %, H = 5,92 %, Aschefrei.

Das Schiffchen wog nach der Verbrennung 0,0002 g mehr, als es ohne Substanz gewogen hatte.

b) 0,1923 g Substanz ergaben 0,2465 g Co_2 und 0,1035 g H_2O
C = 34,99 %, H = 5,97 %, Aschefrei.

N:

a) 0,2004 g Substanz erforderten 20,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 14,53 %.

b) 0,2192 g Substanz erforderten 22,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 14,37 %.

S:

0,2421 g Substanz gaben 0,1880 g $BaSO_4$, S = 10,66 %.

18. Umfällung (nach vorhergehender 2 maliger Ölfällung, also VI. Staffel). Ausbeute 55 g.

C und H:

a) 0,1018 g Substanz gaben 0,1278 g CO_2 und 0,0549 g H_2O
C = 34,38 %, H = 5,99 %, Aschefrei.

b) 0,2054 g Substanz gaben 0,2563 g CO_2 und 0,1094 g H_2O
C = 34,03 %, H = 5,92 %, Aschefrei.

N:

a) 0,2014 g Substanz erforderten 21,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 14,95 %.

b) 0,1826 g Substanz erforderten 19,65 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 15,06 %.

S:

0,1651 g Substanz gaben 0,1331 g $BaSO_4$, S = 11,08 %.

21. Umfällung (nach vorhergehender 2 maliger Ölfällung, also VII. Staffel).

Ausbeute 41 g.

C und H:

a) 0,2079 g Substanz gaben 0,2611 g CO_2 und 0,1125 g H_2O
C = 34,25 %, H = 6,01 %, Aschefrei.

b) 0,1954 g Substanz gaben 0,2464 g CO_2 und 0,1044 g H_2O
C = 34,39 %, H = 5,94 %, Aschefrei.

N:

a) 0,1964 g Substanz erforderten 21,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 15,17 %.

b) 0,1684 g Substanz erforderten 18,07 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 15,02 %.

S:

0,1417 g Substanz gaben 0,1116 g $BaSO_4$, S = 10,81 %.

Der Genauigkeit wegen wurde nochmals umgefällt, also

24. Umfällung (nach vorhergegangener 2maliger Ölfällung, also VIII. Staffel).

Ausbeute 32 g.

C und H:

0,1737 g Substanz gaben 0,2192 g CO_2 und 0,0924 g H_2O
C = 34,42 %, H = 5,91 %, Aschefrei.

N:

a) 0,1478 g Substanz erforderten 15,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 14,96 %.

b) 0,1292 g Substanz erforderten 14,07 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,
N = 15,25 %.

S:

0,1779 g Substanz gaben 0,1401 g $BaSO_4$, S = 10,92 %.

Die Konstanz für C wurde also bei der 18. Umfällung, die für N bei derselben, die für S schon bei der 12. erreicht. Der Wert für H entsprach von Anfang an schon dem Durchschnittswerte; seine Schwankungen waren verhältnismäßig gering — er konnte also als Kriterium für die Reinheit des Präparates nicht gelten.

Bei der direkten Umfällung des Sulfates wieder in das feste Sulfat (also ohne Ölfällung) wurde die Konstanz des C-Wertes schon eher erreicht.

I. Umfällung:

a) 0,1524 g Substanz gaben 0,2070 g CO_2 und 0,0876 g H_2O
C = 36,61 %, H = 6,31 %, Asche = 0,39 %.

b) 0,1137 g Substanz gaben 0,1511 g CO_2 und 0,0633 g H_2O
C = 36,24 %, H = 6,19 %, Asche = 0,58 %.

II. Umfällung:

a) 0,1421 g Substanz gaben 0,1825 g CO_2 und 0,0771 g H_2O
C = 35,05 %, H = 6,04 %, Asche = 0,19 %.

b) 0,1544 g Substanz gaben 0,1990 g CO_2 und 0,0872 g H_2O
C = 35,17 %, H = 6,28 %, Asche = 0,25 %.

III. Umfällung:

0,1334 g Substanz gaben 0,1674 g CO_2 und 0,0736 g H_2O
C = 34,26 %, H = 6,15 %, Aschefrei.

Hier entspricht also schon der bei der 3. Umfällung festgestellte C-Wert dem vorhin erst bei der 18. gefundenen. Bei Darstellung C wurde ebenfalls der konstante C-Wert nach der 3. Umfällung gefunden:

C und H:

a) 0,2006 g Substanz gaben 0,2519 g CO_2 und 0,1071 g H_2O
C = 34,25 %, H = 5,95 %, Aschefrei.

b) 0,1940 g Substanz gaben 0,2426 g CO_2 und 0,1026 g H_2O
C = 34,11 %, H = 5,89 %, Aschefrei.

N:

0,2316 g Substanz gaben 29,95 ccm tr. N.
t = 18°, Bar. 757 mm
N = 15,17 %.

Bei Darstellung C wurde das Oxyhämoglobin im Verdauungsapparate zersetzt. Die C-, H- und N-Werte des Sulfates dieser Darstellung stimmen mit denen der Sulfate von Darstellung B überein. Es geht also daraus hervor,

daß auch bei der im Verdauungsapparate bewirkten gleichmäßigeren Zersetzung kein anderes Produkt entsteht, als bei Darstellung B.

Zusammenstellung der Analysenwerte:

%	Darstellung B 1			Darstellung B 2						Darst. C
	Umfällung									
	1.	2.	3.	9.	12.	15.	18.	21.	24.	3.
C	36,61 36,24	35,05 35,17	34,26	37,77 37,92	36,02 36,15	35,34 34,99	34,38 34,03	34,25 34,39	34,42	34,25 34,11
H	6,31 6,19	6,04 6,28	6,15	6,13 6,00	6,26 5,89	5,92 5,97	5,99 5,92	6,01 5,94	5,91	5,95 5,85
N				13,42 13,23	13,8 14,09	14,53 14,37	14,95 15,06	15,17 15,02	14,96 15,25	15,17
S				10,01 10,3	10,89	10,66	11,08	10,81	10,97	

Zusammenstellung der konstanten Werte.

%	Darstellung B 1	Darstellung B 2			Darstellung C	Durchschnitt
	Umfällung					
	3.	18.	21.	24.	3.	
C	34,26	34,38 34,03	34,25 34,39	34,42	34,25 34,11	34,26
H	6,15	5,99 5,92	6,01 5,91	5,91	5,95 5,85	5,98
N		14,95 15,06	15,17 15,02	14,96 15,25	15,17	15,08
S		11,08	10,81	10,97		10,95

Also enthält das dargestellte Kyrinsulfat:

34,26% C
5,98% H
15,08% N
10,95% S
33,73% O
100,00%.

Der Versuch, den Stickstoff, wenn auch nicht ganz, so doch in einem bestimmten Verhältnisse nach der Methode von Knop-Hüfner durch Vermischen der in Wasser gelösten Substanz mit unterbromigsaurem Natron in Freiheit zu setzen und zu bestimmen, und dadurch vielleicht einen tieferen Einblick in die Natur des Kyrins zu erhalten, ergab keine sicheren Resultate. Wenn auch nicht erwartet wurde, daß der Stickstoff wie beim Harnstoff quantitativ abgespalten werden sollte, so konnte man immerhin vermuten, daß die Menge des in Freiheit gesetzten N bei allen Bestimmungen, wenigstens was die reinen oder ziemlich reinen Präparate anbetrifft, in einem bestimmten Verhältnisse zum Gesamtstickstoff stünde, umsomehr als Fränkel angibt, daß er derartige Versuche mit dem Histidin angestellt hat. Nach seinen Angaben[1]) wird durch unterbromigsaures Natron $^1/_3$ des Histidin-N, also eins von den 3 N-Atomen, als elementarer Stickstoff abgespalten. Da das aus dem Hämoglobin dargestellte Kyrin nun ebenfalls Histidin enthält, konnte ähnliches hier erwartet werden; außerdem war es nicht ausgeschlossen, daß auch die Komplexe der übrigen Spaltungsprodukte auf diese Weise N in proportionaler Menge in Freiheit setzten.

Zur Herstellung des unterbromigsauren Natrons oder der Bromlauge wurden 68 g Natriumhydrat in 1 l Wasser gelöst und dazu 50 g Brom = 16 ccm gesetzt. Sie wurde für jede

[1]) Fränkel, Darstellung und Konstitution des Histidins. Aus den Sitzungsberichten der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse Bd. CXII. Abt. II b. März 1903.

Bestimmung frisch bereitet, wenn nicht eine Reihe von Bestimmungen nebeneinander ausgeführt wurde. Zur Verwendung kam der bekannte Hüfnerapparat. Um eine recht schnelle und intensive Vermischung der im untersten kalibrierten Kölbchen befindlichen, in Wasser gelösten Substanz mit der Bromlauge zu ermöglichen, wurde vor dem Öffnen des das Kölbchen verschließenden Hahns Quecksilber in den bauchig erweiterten Teil der Röhre gefüllt. Beim Beginn der Bestimmung nun trat nach Öffnen des Hahns das Quecksilber schnell in das Kölbchen ein und drängte die Substanz nach oben. Die Stickstoffentwicklung begann sofort, setzte sich einige Zeit energisch fort und ließ dann allmählich nach. In bestimmten Zeitabschnitten wurden die Volumina abgelesen. Ein bestimmter Zeitpunkt, wann die Entwicklung zu Ende war, konnte nicht festgestellt werden; bei einer Erschütterung des Apparates oder bei einer Erhöhung der Temperatur wurde nach scheinbarem Aufhören immer noch N in Freiheit gesetzt.

In 10 ccm derselben Lösung war vorher nach Kjeldahl der Gesamtstickstoff ermittelt worden. Das den freien N enthaltende Eudiometer wurde nach 22 Stunden in ausgekochtes Wasser gebracht und aus dem nun abgelesenen Volumen mit Rücksicht auf Temperatur und Barometerstand das Gewicht des freigewordenen Stickstoffes ermittelt und auf den Gesamt-N bezogen.

Zahlreiche von mir und anderen ausgeführte Bestimmungen ergaben aber trotz intensiver Vermengung der Lösungen und trotz des Umstandes, daß die Bromlauge immer in derselben Temperatur zur Verwendung kam, keine übereinstimmenden und sicheren Resultate.

III. Spaltungen des Kyrins.

Sowohl für die qualitativen als auch für die quantitativen Spaltungen wurde das reine Kyrinsulfat 12 Stunden lang am Rückflußkühler mit der 10—15 fachen Menge Schwefelsäure ($^2/_3$ Gewichtsmenge Wasser, $^1/_3$ Gewichtsmenge konzentrierte Säure) gekocht und dadurch das Kyrinmolekül vollständig hydrolytisch gespalten.

A. Qualitative Spaltung.

Die qualitative Spaltung des Kyrins sollte Aufschluß darüber geben, welche einzelnen Basen und Amidosäuren sich zu einem Komplex im Hämoglobinmolekül zusammengeschlossen haben. Zu diesem Zwecke wurden zuerst Basen und Amidosäuren von einander getrennt. Das geschah auf folgende Weise:

12 g Sulfat der 24. Umfällung wurden in oben angegebener Weise gekocht. Die filtrierte und mit Wasser verdünnte Lösung wurde zur Ausfällung der Basen vorsichtig und unter Vermeidung eines Überschusses mit 10%iger Phosphor-Wolframsäure versetzt, filtriert und gut mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat (Filtrat I) wurde später auf Amidosäuren geprüft.

a) Basen.

1. Der weiße Niederschlag, der ein Gemenge von Basen-Phosphorwolframaten ist, wurde in Wasser suspendiert, in Ammoniak in der Wärme gelöst, die Lösung zur Ausfällung der Phosphor-Wolframsäure und der Schwefelsäure mit

Barythydrat versetzt, der eventuell überschüssig vorhandene Baryt durch Ammonkarbonat ausgefällt, filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand, ein Gemenge der freien Basen, bildete wieder einen zähen braunen Sirup. Er wurde in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure neutralisiert. Eine Probe dieser Lösung gab sowohl auf Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung[1]) als auch von Merkurisulfat[2]) (75 g HgO werden in 500 ccm 15 volumprozentiger erhitzter Schwefelsäure gelöst) einen dicken Niederschlag. Es war also anzunehmen, daß bei der Spaltung des Kyrins Histidin entsteht. Zur vollständigen Ausfällung desselben setzte ich der Basenlösung soviel H_2SO_4 zu, daß sie $2^1/_2\,\%$ig wurde[3]) und fällte mit $HgSO_4$ unter Vermeidung eines Überschusses, da sich das Histidin darin ebenso wie im Überschuß der ammoniakalischen Silberlösung löst. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und das Filtrat zur weiteren Untersuchung aufgehoben (Filtrat II). Das Histidin-Quecksilber wurde nun in Wasser verrührt und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom ausgefällten Quecksilbersulfid wurde abfiltriert und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft verjagt. Um das im Filtrat befindliche Histidin als solches zu charakterisieren, versuchte ich, es in eins der beiden Chlorhydrate überzuführen. Zu diesem Zwecke wurde das Filtrat mit Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt. Beim vollständigen Eindampfen der Lösung schieden sich Kristalle aus, die aber noch ziemlich dunkelgelb gefärbt waren. Sie wurden deshalb nochmals in Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle gekocht, wiederum Salzsäure zugefügt und auf dem Wasserbade ziemlich eingeengt. Beim vollständigen Verdunsten des Wassers über Schwefelsäure im evakuierten Exsikkator schieden sich schöne, große, glashelle Kristalle aus. Sie wurden auf kleinem Saug-

[1]) Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 194, 195.

[2]) Hopkins und Cole, Journ. of Physiology. 27, 418. Kossel und Patten, Zur Analyse der Hexonbasen, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, Seite 40.

[3]) Kossel und Patten, a. a. O. S. 40 u. 41.

filter abgesaugt und mit absolutem Alkohol und Äther I ausgewaschen. Die Untersuchung ergab, daß ich es mit dem von Kutscher[1]) zuerst dargestellten Histidindichlorid von der Formel $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2\,HCl$ zu tun hatte.

I. 0,2178 g Substanz gaben 0,2732 g AgCl.

II. 0,2787 g Substanz erforderten 36,1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2\,HCl$:
Cl = 31.03 %	31,14 %
N = 18,15 %	18,42 %.

Schmelzpunkt 233°; angegeben 231—233°.[2]) Kristallwasser wurde nicht abgegeben; auch bei 140° gab das von Kutscher dargestellte Histidindichlorid kein Wasser ab;[3]) eine Lösung meines Histidinsalzes gab beim Erhitzen intensive Biuretreaktion, in der Kälte zeigte sich blaue Farbe; Histidin gibt beim Erhitzen intensive Biuretreaktion.[4]) Ausbeute ca. $1^3/_4$ g.

2. Zur weiteren Untersuchung wurde in das Filtrat vom Histidin-Quecksilber-Niederschlage (Filtrat II) Schwefelwasserstoff eingeleitet, vom Quecksilbersulfid abfiltriert und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft verjagt. Die Flüssigkeit wurde dann nochmals filtriert, die Schwefelsäure mit Barythydrat ausgefällt, der überschüssige Baryt mit Ammonkarbonat ausgeschieden und das Filtrat wieder bis zum Sirup eingedampft, der nun auf Arginin zu untersuchen war.

Zur weiteren Behandlung war eine 10 %ige Silbernitrat- und eine kaltgesättigte Barytlösung nötig. Der eingedampfte Sirup wurde in wenig Wasser gelöst, filtriert und nun vorsichtig Silbernitrat hinzugesetzt, bis ein Tropfen der Lösung auf einem Uhrglase mit einem Tropfen kaltem Barytwasser zusammengebracht, eben anfing, statt eines weißen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25,** 199 ff.; **28,** 383.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35,** 385.
[3]) Ebendaselbst **35,** 385.
[4]) Herzog, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37,** 248.

einen gelben Niederschlag zu geben. Durch das Silbernitrat war ein flockiger Niederschlag entstanden. Zu diesem wurde nun bis zur Sättigung gepulverter Baryt gefügt. Das Ganze bekam jetzt eine dunklere Färbung. Es wurde filtriert, mit Barytwasser gut ausgewaschen und das Filtrat zur späteren Prüfung auf Lysin (Filtrat III) aufgehoben.

Der Niederschlag wurde nun in Wasser verrührt und zur Ausfällung des Silbers und des Baryts mit Salz- und Schwefelsäure geschüttelt. Das Arginin ging dabei in Lösung. Von AgCl und $BaSO_4$ wurde abfiltriert und aus dem Filtrate das Arginin mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Phosphorwolframat wurde nun wie früher in wässerigem Ammoniak gelöst, die Lösung mit Baryt und Ammonkarbonat behandelt und schließlich das Filtrat im tarierten Schälchen zum Sirup eingedampft. Es wurde nun versucht, das saure Silbersalz des Arginins darzustellen. Der Sirup wog 0,8 g. Er wurde in möglichst wenig Wasser gelöst, die Lösung mit Salpetersäure schwach angesäuert, mit ca. 1 g festen Silbernitrates versetzt, nochmals filtriert und zum Filtrate zwecks Ausfällung des Argininsalzes zuerst Alkohol und dann von Zeit zu Zeit Äther zugegeben. Nach mehrtägigem Stehen hatte sich das Salz ausgeschieden, allerdings nicht in schönen Kristallen. Daher wurde abfiltriert, das Salz in wenig Wasser gelöst und dieses im evakuierten Exsikkator verdunstet, wobei das saure Argininsilbernitrat in kleinen weißen Kristallen auskristallisierte. Die Ausbeute betrug 0,9 g. Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

I. 0,1546 g Substanz gaben 0,0412 g Ag.
II. 0,1578 g Substanz gaben 27,2 ccm tr. N bei 15° und 758,5 mm.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3$:
Ag = 26,62 %	26,55 %
N = 20,35 %	20,68 %.

Für eine C- und H-Bestimmung reichte die Substanz nicht mehr aus, da ich durch Unvorsichtigkeit einen Teil derselben verlor. Die Schmelzpunktsbestimmung ergab 179°

in Übereinstimmung mit den von Gulewitsch[1]) gefundenen Werten.

3. Das Filtrat vom Argininniederschlage (Filtrat III) wurde nun auf Lysin, die dritte der möglicherweise vorhandenen Hexonbasen untersucht. Lysin wird durch Silbernitrat und Barytwasser nicht gefällt, mußte also, wenn überhaupt vorhanden, im Filtrate in Lösung sein. Dieses wurde daher mit Salzsäure und Schwefelsäure geschüttelt, dann wurde vom ausgefällten AgCl und $BaSO_4$ filtriert und das Filtrat mit Phosphor-Wolframsäure versetzt. Es fiel eine ziemlich große Menge Lysinphosphorwolframat aus, zum Teil sogar in kleinen weißen Nadeln. Der Niederschlag wurde abgesaugt, in bekannter Weise mit Ammoniak, Barythydrat und kohlensaurem Ammonium behandelt und wieder in gewogenem Schälchen bis zum Sirup eingedampft. Um nachzuweisen, daß dieser aus Lysin bestand, wurde versucht, zwei Salze desselben darzustellen und zwar das kristallalkoholhaltige Platinchloridsalz[2]) und das Pikrat.[3]) Der Sirup wog ca. $1\,^1/_2$ g. Er wurde in Wasser gelöst, die Lösung auf 30 ccm aufgefüllt und in 2 Portionen geteilt.

α) Die eine Portion wurde zur Darstellung des Lysinchloroplatinates benutzt. Zu diesem Zwecke wurde sie wieder vollständig eingedampft, in wenig Wasser gelöst und die berechnete Menge festes Platinchlorid, hier 2 g, zugegeben. Das Ganze wurde darauf mit Alkohol bis zur Trübung, schließlich auch mit ein wenig Äther versetzt und im Eisschranke aufbewahrt. Nach abermaligem Zusatze von Alkohol am nächsten Tage schieden sich lange rötlichgelbe glänzende Nadeln ab. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Exsikkator aufbewahrt. An der Luft verschmierten sie leicht. In vollständig trockenem Zustande verlieren sie ihren Glanz. Ausbeute 1,4 g. Das über

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **27,** 200.

[2]) M. Siegfried, Ber. d. d. chem. Ges. **24,** 1428 (1891). Derselbe, Arch. f. Anat. u. Physiol. 227 (1891).

[3]) A. Kossel, Über die Konstitution der einfachsten Eiweißstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie **25,** 180 ff.

Schwefelsäure getrocknete Salz gab folgende Werte und erwies sich dadurch als kristallalkoholhaltiges Lysinplatinchlorid.

I. 0,2132 g Substanz gaben 0,0694 g Pt,

II. 0,3007 g Substanz erforderten 9,65 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2\,HCl \cdot PtCl_4 + C_2H_5OH$:
Pt = 32,54 %	32,37 %
N = 4,49 %	4,67 %.

Zur Vertreibung des Kristallalkohols wurde eine Probe des Salzes im Trockenschranke bei 90° getrocknet.

0,2308 g Substanz wogen nach 2 Tagen konstant 0,2135 g.

Alkohol = 0,0173 g.

0,2135 g gaben 0,0747 g Pt. Pt = 35,01 %.

Berechnet Pt = 35,07 %.

β) Die andere Portion des Sirups wurde zur Darstellung des Pikrates benutzt. Nachdem sie nochmals eingedampft und wieder in wenig Wasser gelöst war, wurde die Lösung mit (der doppelten berechneten Menge vom Gewichte des verwendeten Sirups) Pikrinsäure im festen Zustande versetzt, das sofort ausgeschiedene Pikrat abfiltriert und aus heißem Wasser umkristallisiert. Es entstanden beim Erkalten lange Prismen, die für das Pikrat charakteristisch sind und sich auch als solches erwiesen. Ausbeute 1,1 g.

0,2367 g gaben 37,5 ccm tr. N bei 16° und 756 mm.

Gefunden:	Berechnet für $C_{12}H_{17}N_5O_9$:
N = 18,65 %	18,71 %.

Diese Bestimmung genügt zur Charakterisierung des Salzes als Lysinpikrat.

Im Hämoglobinmoleküle sind also alle 3 Hexonbasen: Histidin, Arginin und Lysin in einem basischen Komplexe vereint.

b) Amidosäure.

Das Filtrat vom Basenphosphorwolframatniederschlage (Filtrat I) war nun noch auf andere in Lösung befindliche Körper, auf Mono-Amidosäuren zu untersuchen; denn sowohl bei der Gelatine als auch beim Kasein waren am Aufbau des Kyrins Amidosäuren beteiligt, sodaß ein Gleiches hier vermutet werden konnte. Außerdem zeigten die (später zusammengestellten) Stickstoffverteilungsbestimmungen, daß ein bestimmter Prozentsatz des Stickstoffs nicht den Basen zugesprochen werden konnte, also anderen Körpern, vermutlich Amidosäuren, zukam, die zu isolieren die nächste Aufgabe war.

Zu diesem Zwecke wurde das Filtrat mit Barythydrat versetzt, vom Niederschlage abfiltriert, der überschüssige Baryt mit Ammonkarbonat gefällt und zum Sirup eingedampft. Dieser wurde in wenig Wasser gelöst und nun zuerst auf Glutaminsäure in folgender Weise geprüft: Nach Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung (zu $AgNO_3$ wird NH_3 gefügt, bis sich der entstandene Niederschlag gerade wieder gelöst hat) wurde Silbernitrat so lange zugefügt, bis sich nichts mehr ausschied. Der Niederschlag wurde abgesaugt und das Filtrat aufgehoben (Filtrat IV), der Niederschlag dann in zwei Portionen geteilt. Die eine wurde in Salpetersäure gelöst, wobei ein unlöslicher Rückstand zurückblieb; von diesem wurde abfiltriert und zum Filtrate vorsichtig nach Zusatz von wenig Silbernitrat verdünnter Ammoniak gefügt. Es entstand wiederum ein Niederschlag, der sich als glutaminsaures Silber erwies. Im Überschusse des Ammoniaks löst sich dieses wieder.

Die Analysen der bei 70—80° getrockneten Substanz ergaben folgende Werte:

I. 0,1408 g Substanz gaben 0,0834 g Ag,
II. 0,1544 g Substanz gaben 0,0928 g CO_2 und 0,0306 g H_2O und 0,0916 g Ag.

Gefunden:	Berechnet für $C_5H_7NO_4Ag_2$:
Ag = 59,26 %; 59,33 %	59,81 %
C = 16,39 %	16,63 %
H = 2,19 %	1,95 %.

Aus der anderen Portion wurde das Glutaminsäurechlorhydrat darzustellen versucht. Der Niederschlag wurde in Wasser verrührt und zur Ausfällung des Silbers mit Salzsäure versetzt, in das eingeengte Filtrat Chorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet und die Lösung über Schwefelsäure in den evakuierten Exsikkator gestellt. Es schieden sich weiße Kristalle aus, die in konzentrierter Salzsäure schwer, in Wasser dagegen leicht löslich waren und ohne Zweifel das gewollte Chlorhydrat darstellten — ein Analysieren derselben war leider bei der zu geringen Ausbeute nicht möglich.

Zur Prüfung auf noch andere Amidosäuren wurde das Filtrat von der Glutaminsäuresilberfällung (Filtrat IV) durch Schwefelammonium entsilbert und dann zur vollständigen Trockene eingedampft. Der gepulverte Rückstand, der eine Menge Ammoniumnitrat enthalten mußte, wurde längere Zeit am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol gekocht und löste sich bis auf einen ganz minimalen Rest anorganischer Natur vollständig in demselben. Glykokoll, dessen Abwesenheit ja von vornherein feststand, da es bis jetzt im Hämoglobin überhaupt noch nicht gefunden worden ist, war also nicht vorhanden. Aber auch sonst erwies sich die Prüfung auf weitere Amidosäuren als negativ:

Die alkoholische Lösung des Ammonnitrates schied beim Erkalten nichts aus; ein Zusatz von alkoholischem Silbernitrate und einigen Tropfen alkoholischen Ammoniaks ergab keine Fällung.

Es ist also ausgeschlossen, daß bei der Spaltung des dargestellten Kyrins irgend eine in absolutem Alkohol bezw. in einer Lösung von Ammoniumnitrat in absolutem Alkohole lösliche Amidosäure entsteht.

Auch auf freien Ammoniak war zu prüfen; er entsteht nicht bei der Spaltung des Kyrins mit verdünnter Schwefelsäure. Je 50 ccm der Spaltungslösung des mit Schwefelsäure gespaltenen Sulfates der 21. und 24. Umfällung wurden mit Magnesia usta destilliert, das Destillat zur Entfernung der Kohlensäure gekocht[1]) und nachdem es abgekühlt war, zurück-

[1]) Fr. Müller, Zeitschr. f. physiol. Chemie **38**, 286.

titriert. Es wurden gebraucht für den in 50 ccm enthaltenen

	Gesamtstickstoff:	Ammoniak-(Amid-)stickstoff:
bei Umfällung: 21:	81,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	0,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
24:	77,0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	0.25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ergibt für freien Amidstickstoff

bei Umfällung 21: 0,49 %, also noch nicht $^1/_2$ %,
„ „ 24: 0,33 %, also rund $^1/_3$ %.

Es entstanden also bei der Spaltung des Kyrins nur Spuren von Ammoniak; dieser kann also nicht als Spaltungsprodukt gelten.

Als Spaltungsprodukte des aus dem Hämoglobin isolierten Kyrins ließen sich also lediglich nachweisen: Histidin, Arginin, Lysin und Glutaminsäure.

B. Quantitative Spaltungen.

Die Spaltung des Kyrins mit verdünnter Schwefelsäure ermöglichte nicht nur die Feststellung und Isolierung der am Aufbau des Kyrins beteiligten Spaltungsprodukte; sie ließ sich auch quantitativ verwerten. Es wurde dabei vorausgesetzt, daß die Spaltung des Kyrinmoleküls nur in einer Richtung erfolgte, sodaß dabei ausschließlich, also quantitativ, diese typischen, im Hämoglobin wie in anderen Eiweißkörpern schon präformierten Gruppen Arginin, Histidin, Lysin und Glutaminsäure erhalten wurden, daß sie aber nicht auch an irgend einer anderen Stelle des Moleküls ansetzte, wodurch ja auch noch Spaltungsprodukte irgend welcher anderen Art entstehen würden.

Alle bei der Spaltung des Kyrins isolierten Komplexe enthalten Stickstoff und zwar in verschiedenen Mengen, aber auch in verschiedenen Bindungsformen, die Basen den Diamido-N oder Basen-N, die Säuren den Monoamido-N oder den Säure-N; der am leichtesten abspaltbare Ammoniak- oder Amid-N ist ja, wie schon nachgewiesen, nicht vorhanden.

Es ist nun verhältnismäßig leicht, jede der in der Zersetzungslösung vorhandenen Stickstoffarten, also hier den Basen-N und den Amidosäuren-N für sich getrennt zu bestimmen und damit einen Schluß zu ziehen auf die proportionalen Mengen der beiden Kategorien N und damit der beiden Kategorien Basen und Säuren. Die Methode beruht auf der durch Spaltung mit siedender Schwefelsäure bewirkten Fällbarkeit des Basenstickstoffes mit Phosphor-Wolframsäure und Unfällbarkeit des Säurestickstoffes durch dieses Reagens. Man hat also nach der dadurch ermöglichten Trennung nur noch im Niederschlage den Basen-N und im Filtrate den Säure-N zu ermitteln. Die der Methode anhaftenden Fehler wurden durch eine später zu beschreibende Korrektion zu beseitigen versucht.

Aber auch noch in anderer Beziehung ließen sich die Bestimmungen von Basen-N und Amido-N verwerten. War das gespaltene Präparat rein, so mußte das Verhältnis der beiden N-Werte trotz der verschiedenen Umfällungen konstant sein, und umgekehrt, zeigte das Verhältnis von Basen- und Säure-N immer dieselben Zahlen, so konnte diese Übereinstimmung sehr wohl zusammen mit der Konstanz des Kohlenstoffwertes ein Kriterium für die Unveränderlichkeit und damit Reinheit der Substanz sein. Aus diesem Grunde wurde nicht nur das reine Kyrinsulfat, sondern das aller Umfällungen gespalten und dann Gesamt-N, Basen-N und Säure-N bestimmt.

Die Verteilung des Basen- und Säurestickstoffes bei den Präparaten der einzelnen Umfällungen.

Die Zersetzung des Kyrins wurde ausgeführt nach der Vorschrift von Kossel und Kutscher ebenso wie die qualitative Spaltung durch 12stündiges Kochen mit einer Mischung von 1 Gewichtsteil konzentrierter H_2SO_4 und 2 Gewichtsteilen Wasser am Rückflußkühler; es genügten zur jedesmaligen Spaltung 2 g festes Sulfat. Die Zersetzungslösung wurde dann abfiltriert und auf 100 ccm aufgefüllt. In je 10 oder 20 ccm wurde der Gesamtstickstoff ermittelt, in je 20 der

Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen und im Filtrate von diesem Niederschlage der durch die Säure nicht ausgefällte Amidosäurestickstoff. Für die Genauigkeit der Bestimmungen war es unerläßlich, nur ausgeätherte Phosphorwolframsäure zu verwenden.

Die Bestimmungen selbst wurden nach Kjeldahl ausgeführt; die Verbrennung geschah mit dem nach den Angaben Siegfrieds konstruierten und von ihm beschriebenen Schüttelapparate,[1]) dessen Vorzüge bei allen Bestimmungen, besonders beim Aufschluß der die Phosphorwolframsäure enthaltenden Lösungen oder Niederschläge klar zu Tage traten. Ein Stoßen des Kolbeninhaltes und Springen der Kolben ist so gut wie ausgeschlossen; außerdem geht die Verbrennung, da mit größerer Flamme gearbeitet werden kann, viel schneller vor sich. Es wurde nie länger als höchstens zwei Stunden verbrannt. Die Oxydation geschah mit Kaliumpermanganat.

Die Bestimmungen des Basen- und Amidosäure-N wurden nun in folgender Weise ausgeführt: Je 20 ccm der Zersetzungslösung wurden mit derselben Menge Wasser verdünnt und dazu eine zu messende Quantität 10%iger Phosphorwolframsäure gesetzt, bis kein Niederschlag mehr erfolgte. Um dies festzustellen, wurde nach Absitzen des Niederschlages eine kleine Menge der klaren Flüssigkeit mit einer Kapillarpipette herausgenommen und im Reagenzglase mit einem Tropfen Phosphorwolframsäure versetzt. Die Probe wurde wieder in die Lösung zurückgespült und dieses Verfahren so oft wiederholt, bis die Fällung beendigt war, worauf Wasser nachgefüllt wurde, bis der Gesamtgehalt der Flüssigkeit an Schwefelsäure 5% betrug. Das Ganze wurde nun auf dem Wasserbade erwärmt, wobei sich der größte Teil des Niederschlages löste. Dann ließ ich über Nacht stehen. Beim Erkalten schied sich der Niederschlag wieder aus. Anderen Tages wurde bei 20° abgesaugt, was glatt von statten ging, und mit einem gemessenen Volumen (50 ccm) einer Mischung[2]) von 5%iger

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **41**, 1.

[2]) 1 l 10%iger H_2SO_4 und 1 l 10%iger Phosphorwolframsäure werden zusammengegossen.

Schwefel- und 5%iger Phophorwolframsäure ausgewaschen. Der Niederschlag wurde nun ohne Verlust samt der (natürlich N-freien) Filterscheibe in den Aufschlußkolben gebracht; ebenso das Filtrat, nachdem es vorher gemessen war: das gefundene Volumen ergab nach Abzug der Waschflüssigkeit die Menge des Filtrates. Das Eindampfen desselben samt der Waschflüssigkeit geschah gleich im Kolben. Nach beendigter Verbrennung wurde destilliert und titriert. Das bei der Verbrennung abgeschiedene Wolframtrioxyd war gelb gefärbt; ließen sich Reste dieses gelben Niederschlages, die sich an der Kolbenwand angesetzt hatten, beim Überführen aus dem Kjeldahl- in den Destillierkolben nicht mit Wasser herausspülen, so benutzte ich einige ccm kalter konzentrierter Natronlauge zur Lösung. Stickstoffverluste waren hierbei kaum zu befürchten.

Die verbrauchte Menge $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, bezogen auf die zur Bestimmung des Gesamtstickstoffes erforderliche Anzahl ccm gab aber noch nicht das richtige Verhältnis zwischen Basen- und Säure-N, denn die Basen fallen mit Phosphorwolframsäure nicht ganz quantitativ aus, da die Phosphorwolframate der Hexonbasen mehr oder weniger löslich sind; außerdem war wohl anzunehmen, daß beim Ausscheiden nach vorherigem Erwärmen ein, wenn auch kleiner Teil der Phosphorwolframate doch in Lösung blieb. Diese Löslichkeit der Phosphorwolframate mußte berücksichtigt werden. Sie ist abhängig von der Menge der angewandten Flüssigkeit, sehr abhängig von der Temperatur, da ja beim Erwärmen die Phosphorwolframate fast vollständig in Lösung gehen. Um diesen bei der Bestimmung der N-Verteilung auf Basen und Säuren zu Fehlern führenden Löslichkeitsverhältnissen gerecht zu werden, mußte ein Weg gefunden werden, eine Korrektion zu schaffen, mit deren Hilfe die nach der Titration gefundenen Werte verbessert wurden.

Die Bestimmung dieses Korrektionswertes

ging aus folgender Überlegung hervor: Wendet man zur Spaltung 50 ccm Wasser und 25 g konzentrierte H_2SO_4 an, so ent-

hält die auf 100 ccm aufgefüllte Zersetzungslösung 25% Schwefelsäure. Nahm ich nun 20 ccm dieser mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Lösung, so brauchte ich zur vollständigen Ausfällung der Basen ca. 30—40 ccm 10%ige Phosphorwolframsäure; das Ganze wurde dann auf 100 ccm aufgefüllt, sodaß der Gehalt an Schwefelsäure genau 5%, an Phosphorwolframsäure etwas unter 5% betrug. Die Lösung, in welcher sich die Phosphorwolframate befanden, entsprach also annähernd einer Lösung von 5%iger H_2SO_4 und 5%iger Phosphorwolframsäure. Diese Lösung wurde erwärmt und nach dem Erkalten bei 20° abgesaugt. Es ergab sich also zur Bestimmung des Korrektionswertes die Aufgabe, festzustellen, wieviel Basenphosphorwolframat in einer 5%igen Schwefelsäure-Phosphorwolframsäurelösung, die derselben Behandlung unterzogen wurde, sich gelöst befand.

Zu diesem Zwecke wurden aus einer der Zersetzungslösungen die Basen ausgefällt, gut abgesaugt und nun in 500 ccm der 5%igen Schwefelsäure-Phosphorwolframsäurelösung suspendiert. Das Ganze wurde auf dem Wasserbade erwärmt und anderen Tages bei genau 20° abgesaugt. Das Filtrat enthielt die gelösten Basenphosphorwolframate, deren Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt wurde. Das Eindampfen geschah im Aufschlußkolben selbst, um Verluste zu vermeiden. Selbst die in der Mischung reichlich vorhandene Menge Phosphorwolframsäure (25 g) erschwerte den Verbrennungsprozeß nicht. Die Resultate der Bestimmungen waren folgende:

50 ccm der Säurelösung verbrauchten

a) 6,23 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

b) 6,1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

c) 6,45 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

also im Mittel: 6,26 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

1 l der 5%igen Schwefelsäure-Phosphor-Wolframsäurelösung erforderte demnach zur Bestimmung des in ihm enthaltenen N rund 12,50 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Die Löslichkeit der Basenphosphorwolframate im angewandten Waschwasser (dieselbe Säurelösung) wurde derart bestimmt, daß 500 ccm dieses Waschwassers bei gewöhnlicher Temperatur durch die auf der Saugplatte befindlichen Basenphosphorwolframate durchgesaugt wurden. Die gelöste Menge ist natürlich abhängig von einem rascheren oder langsameren Durchlaufen der Flüssigkeit; ein leichtes und gleichmäßiges Filtrieren wurde ja eben bewerkstelligt dadurch, daß die Niederschläge erst in der Wärme gelöst und dann durch Erkaltenlassen wieder ausgeschieden wurden. 500 ccm Waschwasser verbrauchten

a) 2,72 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

b) 2,53 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

also im Mittel: 2,63 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

1 l erforderte demnach 5,26 ccm H_2SO_4, das ist nicht ganz die Hälfte des vorhin gefundenen Wertes. Man wird also dem wirklichen Werte sehr nahe kommen, wenn man mit Siegfried[1]) annimmt, daß die Hälfte des für die Füllungslösung gefundenen Korrektionswertes auf das Waschwasser angewendet werden kann. Außerdem war bei den kleinen Quantitäten Waschwasser, die zur Verwendung kamen (50 ccm), eine Abweichung vom richtigen Werte von nur geringem Einflusse. Es wurde also als Korrektionswert angenommen für 1 l Waschflüssigkeit 6,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4. — Die gefundenen Korrektionszahlen können selbstverständlich nur bei diesem zur Untersuchung vorliegenden Kyrin verwendet werden.

Sie waren nun bei den einzelnen Basen-N- und Säure-N-Bestimmungen so anzuwenden, daß die der Filtrat- und der Waschflüssigkeitsmenge entsprechenden ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 den bei der Bestimmung des Basen-N verbrauchten ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 zugezählt, bei den Amidosäuren dagegen in Abrechnung gebracht wurden.

---

[1]) M. Siegfried, Über Kaseinokyrin, Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 61.

Für die einzelnen Basen- und Säurestickstoffbestimmungen ergaben sich folgende Zahlen:

Darstellung B. I. (direkte Umfällungen in das feste Sulfat).

1. Umfällung. 2 g festes Sulfat mit 50 ccm Wasser und 25 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler zersetzt und die Zersetzungslösung ebenso wie bei den folgenden Bestimmungen auf 100 ccm aufgefüllt; für jede Bestimmung wurden 20 ccm genommen. Je 20 ccm der Lösung erforderten für den Gesamt-N

a) 29,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
b) 29,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel: 29,65 ccm.

Filtrat: 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
Waschwasser: 60 ccm, Korrektion also 0,38 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Basen-N. 20 ccm der Lösung erforderten für den Basen-N 17,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 19,43 ccm = 65,53% vom Gesamt-N.

Amidosäure-N. Das Filtrat erforderte 12,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 10,57 ccm = 35,65% vom Gesamt-N.

2. Umfällung. 2 g Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. 20 ccm der Spaltungslösung erforderten

a) 32,75 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
b) 32,70 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel: 32,73 ccm.

Filtrat: 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
Waschwasser: 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N:
21,15 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 d. i. korrigiert 22,71 ccm = 69,39% vom Gesamt-N.

Für Amidosäure-N: 11,85 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 10,29 ccm = 31,44% vom Gesamt-N.

II. Mit Ölfällungen.

9. Umfällung: (III. Staffel) 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt. Gesamt-N. Je 20 ccm der Spaltungslösung erforderten:

a) 28,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

b) 28,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Filtrat 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
Waschwasser 70 ccm, Korrektion also 0,44 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Für Basen-N: 16,9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 18,59 ccm d. i. vom Gesamt-N 64,55% (!)

Für Amidosäure-N: 11,85 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 10,16 ccm, d. i. vom Gesamt-N 35,28%.

Der Wert für den Basen-N ist hier sehr niedrig und weicht von dem vorhin bei der 2. Umfällung gefundenen sehr ab. Diese Abweichung ist analog dem hohen C-Werte bei diesem Präparate (vergl. S. 19). Die 8 malige Ölfällung ist auf die Reinigung des Kyrins ohne großen Einfluß geblieben. Der niedrige Basen-N-Wert beweist also die Verwendbarkeit dieser Bestimmungen zur Kontrolle der Reinheit der Substanz.

12. Umfällung (IV. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 31,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

b) 31,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Filtrat 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
Waschwasser 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Je 20 ccm der Lösung erforderten:

Für Basen-N: 20,15 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 21,71 ccm, d. i. vom Gesamt-N 6870%.

Für Amidosäure-N: 11,67 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, d. i. korrigiert 10,11 ccm, d. i. vom Gesamt-N 32%.

15. Umfällung (V. Staffel) 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 25,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
b) 25,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel: 25,65 ccm.

Filtrat a) 100 ccm b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Waschwasser a) 50 ccm b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 16,9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 18,46 ccm,

b) 17,025 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 18,58 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 71,97%; b) 72,43%.

Für Amidosäure-N:

a) 8,85 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 7,29 ccm,

b) 8,725 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 7,17 ccm, d. i. vom Gesamt-N a) 28,42%; b) 27,96%.

18. Umfällung (VI. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 30,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
b) 30,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel: 30,45 ccm.

Filtrat a) 100 ccm b) 100 ccm; Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Waschwasser: a) 50 ccm b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 20,93 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 22,49 ccm,

b) 21,0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 22,56 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 73,85% b) 74,09%.

Für Amidosäure-N:

a) 9,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 8,04 ccm,

b) 9,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 7,84 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 26,41% b) 25,74%.

21. Umfällung (VII. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 27,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

b) 27,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Waschwasser a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 19,52 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 21,08 ccm,

b) 19,47 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 21,03 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 75,85%, b) 75,65%.

Für Amidosäure-N:

a) 8,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 6,75 ccm,

b) 8,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 6,84 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 24,29%, b) 24,64%.

24. Umfällung (VIII. Staffel). 2 g festes Sulfat wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 28,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
b) 28,9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 } Mittel: 28,85 ccm.

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Waschwasser a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Je 20 ccm der Lösung erforderten für Basen-N

a) 22,62 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 22,18 ccm,

b) 20,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 22,06 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 76,89%, b) 76,46%.

Für Amidosäure-N

a) 8,22 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 6,66 ccm,

b) 8,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 6,84 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 23,09%, b) 23,71%.

Darstellung C. 2 g 3 mal umgefälltes Sulfat von konstantem C-Wert wie oben zersetzt.

Gesamt-N. Je 20 ccm der Zersetzungslösung erforderten

a) 26,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

b) 26,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Filtrat a) 100 ccm, b) 100 ccm, Korrektion also 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Waschwasser a) 50 ccm, b) 50 ccm, Korrektion also 0,31 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Je 20 g der Lösung erforderten für Basen-N

a) 18,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 20,16 ccm,

b) 18,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 20,36 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 76,07%, b) 76,83%.

Für Amidosäure-N

a) 8,05 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 6,49 ccm,

b) 7,90 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, korrigiert 6,34 ccm,

d. i. vom Gesamt-N a) 24,49%, b) 23,93%.

	Darstellung B			Darstellung C
	18. Umfällung %	21. Umfällung %	24. Umfällung %	3. Umfällung %
Basen-N	73,85 74,14	75,85 75,65	76,89 76,46	76,07 76,83
Amidosäure-N	26,41 25,74	24,29 24,64	23,09 23,71	24,49 23,93

Diese Bestimmungen zeigen, daß in den letzten Präparaten eine ziemliche Übereinstimmung in der Stickstoffverteilung eingetreten ist. Fehler von 1—2% sind bei dieser Methode natürlich immerhin noch möglich als unausbleibliche Folgen ihrer Kompliziertheit.

Es ergab sich also, daß in dem aus dem Hämoglobin isolierten Kyrin 76—77% Stickstoff den Basen, 23—24% den Amidosäuren zuzurechnen ist.

Die Verteilung des Basen-Stickstoffs auf die einzelnen gefundenen Basen.

Bei der qualitativen Untersuchung waren im Kyrin gefunden worden Histidin, Arginin, Lysin und Glutaminsäure. Das quantitative Verhältnis zwischen diesen drei Basen insgesamt und der Amidosäure ist bereits festgestellt worden; es blieb nun noch die Aufgabe, zu ermitteln, in welchem Verhältnis die drei Basen untereinander im Kyrinmolekül vorhanden sind. Es liegt auf der Hand, daß zur Beantwortung dieser Frage von vornherein ein Weg ausgeschlossen war: aus einer bestimmten Menge des Kyrins die einzelnen Basen

quantitativ als wohlcharakterisierte Salze zu isolieren. Der Umstand aber, daß alle 3 Körper Stickstoff und zwar in verschiedenen Mengen enthalten, gab auch hier einen Weg zur Lösung. Ich ging auf folgende Weise vor:

4 g der reinen Substanz, Darstellung B, 21. Fällung (Staffel VII) wurden wie früher mit 50 ccm Wasser und 25 g konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht; aus der Lösung wurden mit Phosphor-Wolframsäure die Basen ausgefällt, vom Niederschlage abfiltriert und dieser wie früher behandelt: Lösen in wässerigem Ammoniak, Ausfällen der Schwefel- und Phosphor-Wolframsäure mit Baryt, Abfiltrieren, Ausfällen des überschüssigen Baryts mit Ammonkarbonat, Abfiltrieren und Eindampfen zum Sirup. Dieser Sirup enthielt nur die Basen. Der Sicherheit halber, um alles Ammoniak zu vertreiben, wurde nochmals Wasser zugegeben und wieder eingedampft.

Der Sirup wurde in Wasser gelöst, filtriert und die Lösung auf 250 ccm aufgefüllt. Je 20 ccm dieser Lösung erforderten zur Bestimmung des Gesamtstickstoffes:

a) 15,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

b) 15,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

50 ccm erforderten also:

a) 39,5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

b) 39,25 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Im Mittel: 39,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Histidin und Arginin können zusammen annähernd quantitativ durch Silbernitrat und überschüssigen Baryt gefällt werden,[1]) Histidin für sich allein durch Quecksilbersulfat.[2]) Ich bestimmte darum den Stickstoff der 3 Basen in folgender Weise:

---

[1]) Kossel und Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper, Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 70.

[2]) Vergl. S. 28, Anmerkung.

I. für Histidin und Arginin zusammen,
II. im Filtrate vom Niederschlage dieser 2 Basen für Lysin allein,
III. für Histidin allein. Aus der Subtraktion des dabei gefundenen Wertes von Wert I ergab sich der N-Wert für Arginin.

I. 50 ccm der auf 250 ccm gefüllten Basenlösung wurden zur Fällung von Histidin und Arginin mit 10%iger Silbernitratlösung solange versetzt, bis ein Tropfen der Lösung auf einem Uhrglase mit einem Tropfen kalt gesättigter Barytlösung zusammengebracht, eben anfing, gelben Niederschlag zu zeigen. Die Reaktionsproben wurden selbstverständlich wieder in das Becherglas zurückgespült, dann pulverisierter Baryt hinzugetan, bis sich solcher nicht mehr löste, abgesaugt, der Niederschlag gut mit kaltem Barytwasser ausgewaschen und dann samt Filter quantitativ in den Kjeldahlkolben gespült.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Arginin- + Histidin-N zusammen

1. 27,55 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

2. 27,90 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das sind vom Gesamt-Basenstickstoff
1. 69,91%, 2. 70,84%.

II. Das Filtrat des Arginin- und Histidinniederschlages wurde zur Entfernung des Baryts und des Silbers mit Salzsäure und Schwefelsäure geschüttelt; vom Niederschlage wurde abfiltriert und aus dem Filtrate das Lysin mit Phosphorwolframsäure als Phosphorwolframat ausgefällt, abgesaugt und, um alle Salpetersäure zu entfernen, gut mit Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag wurde mit dem Filter in den Kjeldahlkolben gebracht und unter Zugabe von etwas festem Kaliumsulfat kjeldahlisiert.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Lysinphosphorwolframat

1. 11,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

2. 11,15 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Lysin-N vom Gesamt-Basen-N

1. 28,47%, 2. 28,29%.

III. Zur Bestimmung des Histidinstickstoffes säuerte ich 50 ccm der Basenlösung in einem Becherglase mit wenig Schwefelsäure an, sodaß die Lösung wie bei der qualitativen Isolierung des Histidins ungefähr $2^1/_2$%ig schwefelsauer war. Aus einer Bürette ließ ich dann langsam und unter Umrühren tropfenweise Merkurisulfatlösung zufließen, bis nichts mehr ausfiel — ein Überschuß wurde natürlich vermieden.[1]) Der Niederschlag wurde mit Wasser gut ausgewaschen, samt Filter in den Kjeldahlkolben gebracht und kjeldahlisiert.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Stickstoff des Histidinquecksilbers

1. 15,88 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 16,57 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für den Histidin-N vom Gesamt-Basen-N

1. 40,3%, 2. 42,07%.

Auch das Filtrat des Niederschlages wurde zur Kontrolle kjeldahlisiert. Es erforderte

1. 23,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 22,63 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Arginin- + Lysin-N vom Gesamt-Basen-N

1. 59,14%, 2. 57,45%.

Dieselben Bestimmungen wurden mit ca. 4 g des Sulfates der 24. Umfällung der Darstellung B und mit 4 g des Sulfates der 3. Umfällung der Darstellung C ausgeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Darstellung B., 24. Umfällung.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Gesamt-Basen-N

1. 35,8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 35,65 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

} Mittel: 35,73 ccm.

[1]) Vergl. S. 28.

I. Histidin + Arginin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Histidin-N + Arginin-N

1. 25,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 25,12 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Histidin- + Arginin-N vom Gesamt-Basen-N
1. 71,93%, 2. 70,3%.

II. Lysin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Lysin-N.

1. 8,9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 10,05 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Lysin-N vom Gesamt-Basen-N
1. 24,91%, 2. 28,11%.

III. Histidin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Histidin-N des ausgefällten Histidin-Quecksilbers:

1. 15,0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 15,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Histidin-N vom Gesamt-Basen-N
1. 41,98%, 2. 42,56%.

Das Filtrat erforderte

1. 20,65 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 20,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist vom Gesamt-Basen-N
1. 57,86%, 2. 57,11%.

Darstellung C, 3. Umfällung.

Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Gesamt-Basen-N

1. 38,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4
2. 38,35 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

} Mittel: 38,33 ccm.

I. Histidin- + Arginin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Histidin- + Arginin-N

1. 25,96 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

2. 26,53 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Histidin- + Arginin-N vom Gesamt-Basen-N 1. 67,72%, 2. 69,23%.

II. Lysin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für Lysin-N

1. 11,51 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

2. 11,1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das ist für Lysin-N vom Gesamt-Basen-N 1. 30,04%, 2. 28,95%.

III. Histidin-N. Je 50 ccm der Basenlösung erforderten für den Histidin-N des ausgefällten Histidin-Quecksilbers:

1. 16,15 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

2. war erfolglos.

Das ist für Histidin-N vom Gesamt-Basen-N 42,09%.

Das Filtrat erforderte 21,9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, das ist vom Gesamt-Basen-N 57,13%.

In folgender Tabelle sind die N-Werte zusammengestellt.

Von dem durch Phosphor-Wolframsäure fällbaren Gesamt-Basen-N betragen

Präparat	Histidin- + Arginin-N %	Lysin-N %	Histidin-N %	Arginin-N %
Darstellung B 21. Umfällung	69,91 70,84	28,47 28,25	40,3 42,07	
Darstellung B 24. Umfällung	71,93 68,30	24,91 28,11	41,98 42,56	
Darstellung C 3. Umfällung	67,72 69,23	30,04 28,95	42,09	
Durchschnittswert	69,66	28,12	41,80	27,87

Diese Durchschnitts-Stickstoffwerte der einzelnen Basen im Verhältnis zum Gesamtbasenstickstoffe bezogen auf die rund 77 % des Basenstickstoffes im Kyrinmoleküle ergaben für:

Basen	Gesamtmolekül-stickstoff %
Histidin- + Arginin-N	51,63
Lysin-N	21,66
Histidin-N	32,17
Also Arginin-N	21,46
Glutaminsäure-N	23,00
	98,29

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der Wert für Arginin-N etwas zu niedrig ist. Das Argininphosphorwolframat besitzt gegenüber dem Lysinphosphorwolframate größere Löslichkeit; dieser Umstand macht den Basenniederschlag beim Fällen mit Phosphorwolframsäure aus der Zersetzungslösung etwas argininärmer und wird schließlich auch nicht ganz dadurch aufgehoben, daß der Silberbarytniederschlag nicht vollständig lysinfrei auswaschbar ist, wodurch der Wert für Arginin-N wieder etwas wächst. Dasselbe kommt für den Histidin-N in Betracht; auch das Histidinphosphorwolframat ist löslicher als das Lysinphosphorwolframat. Dementsprechend müßte der Lysin-N-Wert etwas zu hoch sein. Bei den mannigfachen Operationen aber, deren man bedarf, um den Lysin-N allein für sich bestimmen zu können — Schütteln des Filtrates vom Arginin- + Histidinsilberniederschlage mit Salz- und Schwefelsäure, Filtrieren, Auswaschen, Fällen mit Phosphorwolframsäure — müssen Verluste entstehen, die die Höhe des Wertes wieder bedeutend verringern. Für Arginin- und Lysin-N können also nach den gefundenen Zahlen gleiche Stickstoffwerte angenommen werden.

Auch der Histidinstickstoff muß durchweg etwas zu niedrig sein; einmal aus dem vorhin schon angeführten Grunde, zum andern, weil der Histidin-Quecksilberniederschlag im Über-

schusse des Fällungsmittels löslich ist; ob nun zu wenig oder zu viel vom Merkurisulfate zugefügt wird, immer müssen Verluste entstehen, die dem Filtrate zugute kommen: die theoretisch erforderliche Quantität des Fällungsmittels auch praktisch genau zu treffen, dürfte in den seltensten Fällen gelingen.

Die Differenz der Summe des Stickstoffs der einzelnen Spaltungsprodukte im Verhältnis zum Gesamtstickstoffe im Molekül (fast 2 %) findet dadurch ihre Erklärung.

Nach den gefundenen Zahlen verhält sich der Histidin-N zum Arginin-N und Lysin-N rund wie 3 : 2.

Der Wert für den Stickstoff der einzigen vorhandenen Amidosäure, der Glutaminsäure, der rund 23 % beträgt, kann annähernd den Stickstoffwerten für Arginin und Lysin gleichgesetzt werden.

IV. Diskussion über die wahrscheinliche quantitative Zusammensetzung des dargestellten Kyrins.

Die Stickstoffwerte für Arginin und Lysin sind nach dem vorigen annähernd gleich. Da nun das Argininmolekül 4 Atome N, das Lysinmolekül dagegen nur 2 enthält, so sind, wenn die Spaltung quantitativ verläuft, allem Anscheine nach doppelt soviel Lysinmoleküle vorhanden als Argininmoleküle; es besteht also das Verhältnis 2:1.

Der Histidinstickstoff verhält sich nach den ausgeführten Bestimmungen zum Argininstickstoff wie 3:2 oder auch wie 6:4. Da das Histidinmolekül nur 3 Atome N enthält, so verhält sich also die Anzahl der Histidinmoleküle zu der der Argininmoleküle ebenfalls wie 2:1. Es besteht demnach zwischen den Basen das Verhältnis

Histidin	:	Arginin	:	Lysin:
2	:	1	:	2,

sodaß also im Kyrinmoleküle als vorhanden angenommen werden können:

2 Mol. Histidin, 1 Mol. Arginin und 1 Mol. Lysin.

Die Anwesenheit der Glutaminsäure vermag den basischen Charakter des Kyrins nicht erheblich zu beeinflussen, fast $^4/_5$ des Gesamtstickstoffs kommt ja den Basen zu.

Eine andere Zusammensetzung ist unwahrscheinlicher. Das Vorhandensein von mehr als 2 Mol. Histidin ist nach den gefundenen Werten nicht gut möglich; 3 Mol. Histidin würden dann bei Annahme eines Mol. Arginin 37—38 %, bei Annahme von zwei Mol. Arginin 29 % des Gesamt-

stickstoffes beanspruchen. Im ersteren Fall wäre die Differenz mit dem gefundenen Werte 32,17 % zu groß; im zweiten Falle wäre sie ja geringer — jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, daß der gefundene Histidinwert schon einen Mindestwert darstellt. Werden aber nur 2 Mol. Histidin angenommen, so kann nur 1 Mol. Arginin vorhanden sein, da ja der Arginin-N-Wert geringer gefunden wurde als der Histidin-N-Wert.

Ebenso unwahrscheinlich ist die Annahme von mehr als 2 Mol. Lysin, z. B. drei. Es wären dann statt 18 Atomen N 20 im Moleküle zu verteilen, auf die Basen allein 16. Auf 100 bezogen müßten dann 80 % Basen- und nur 20 % Amidosäurestickstoff vorhanden sein; gefunden wurden dagegen für Basen-N rund 77 %, für Amidosäure-N rund 23 %.

Außerdem müßte bei Annahme von 3 Mol. Lysin der Lysin-N vom Gesamt-N 30 % betragen; dieser Wert aber weicht von dem gefundenen (21,66 %) um fast die Hälfte ab.

Als weiteres Argument spricht für die Möglichkeit der angenommenen quantitativen Zusammensetzung die Annäherung der gefundenen Werte an die theoretisch berechneten:

	Gefunden für N %	Berechnet für N %	Differenz %
Histidin	32,17	33,33	— 1,16
Arginin	21,46	22,22	— 0,76
Lysin	21,66	22,22	— 0,56
Glutaminsäure	23,00	22,22	+ 0,78

Zusammenfassung der Resultate.

Durch vorstehende Arbeit wurde festgestellt, daß aus dem Hämoglobin durch allmähliche Hydrolyse ein Komplex der basischen Spaltungsprodukte herausgeschält wird, dem sich als einzige Amidosäure die Glutaminsäure angeschlossen hat. Der Eiweißkomplex des Hämoglobins, das Globin,[1]) enthält also ebenso wie die Gelatine und das Kasein ein Kyrin. Es kann ihm der Name (Hämo)-Globinokyrin gegeben werden. Es entsteht durch allmähliche Zersetzung des Hämoglobins mit Salzsäure bei 37—40°; es zeigt in seinen Reaktionen, seinen Löslichkeitsverhältnissen und anderen Eigenschaften Ähnlichkeit oder Übereinstimmung mit den bis jetzt bekannten Kyrinen. Es unterscheidet sich von diesen durch sein Verhalten Kristallisationsversuchen gegenüber und durch seine Zusammensetzung. Kristalle des Phosphorwolframates sind nicht erhalten worden. Bei der vollständigen Hydrolyse liefert das (Hämo)-Globinokyrin die 3 Basen Histidin, Arginin und Lysin und als Amidosäure die Glutaminsäure. Nicht vorhanden ist u. a. die durch Phosphorwolframsäure aus schwefelsaurer Lösung fällbare α-Pyrrolidinkarbonsäure, sodaß Basen und Amidosäure nach Spaltung mit siedender Säure durch Phosphorwolframsäure getrennt werden können. Fast $^4/_5$ des Stickstoffs kommen den Basen zu, etwas mehr als $^1/_5$ der Amidosäure.

Das (Hämo)-Globinokyrin erweist sich wie die anderen Kyrine als ein einheitlicher, chemisch individueller Körper, der nicht als ein bloßes Gemenge der Spaltungsprodukte anzusehen ist:

---

[1]) Schulz, Zeitschr. für physiol. Chemie **24**, 449.

1. Durch die Konstanz der Zusammensetzung der Sulfate: nach mehrmaligem Umfällen war Konstanz des C-, H-, N- und S-Wertes eingetreten; diese Übereinstimmung blieb bei weiteren Umfällungen, deren letzte die 24. war, bestehen und zeigte sich auch bei einer anderen Darstellung; ein weniger widerstandsfähiger und nicht einheitlicher Körper würde bei den mannigfachen Operationen des öfteren Umfällens in seine Bestandteile zerfallen; ein bloßes Gemenge würde, da beim Umfällen ein nicht unbeträchtlicher Teil der Substanz in der Mutterlauge blieb, keine übereinstimmenden Werte zeigen, denn es ist nicht einzusehen, warum von den einzelnen Bestandteilen gerade proportionale Mengen darin bleiben sollten.

2. Durch die Konstanz der Verteilung des Stickstoffs auf Basen und Amidosäuren nicht nur bei verschiedenen Umfällungen, sondern auch bei verschiedenen Darstellungen.

3. Durch die Phosphorwolframate. Das Kyrinphosphorwolframat enthält den Glutaminsäurekomplex; für sich allein oder aus einem Gemenge, wie es durch die Spaltung mit verdünnter Schwefelsäure entstanden ist, fällt die Glutaminsäure nicht. Außerdem zeigt das Kyrinphosphorwolframat eine andere Konsistenz als die aus der Zersetzungslösung, also aus einem Gemenge gefällten Phosphorwolframate; diese sind schwierig abzusaugen und verschmieren das Filter leicht, während das erstere glatt abgesaugt werden kann.

Die Versuche, das Phosphorwolframat in Kristallen zu erhalten, verliefen negativ. Wäre das Globinokyrin als ein Gemenge anzusehen, so müßten bei diesen Versuchen zum mindesten die leicht entstehenden Lysinphosphorwolframat-Nädelchen unter den nicht kristallisierten Phosphorwolframaten zu erblicken sein.

4. Durch die Biuretreaktion, die schon in der Kälte eintritt. Die einzelnen Spaltungsprodukte geben diese Reaktion nicht, mit Ausnahme des Histidins; bei diesem tritt aber die Reaktion erst beim Erhitzen ein.

Eine weitere Unterstützung kann diese Auffassung darin finden, daß dem Kyrin die optische Aktivität fehlt, während seine Spaltungsprodukte alle optisch aktiv sind.

Durch den Nachweis der Existenz des (Hämo)-Globinokyrins wird also die Anschauung Siegfrieds unterstützt, daß in den Kyrinen Körper von einem ganz besonderen Typus vorliegen, die „als harte Kerne gleichsam aus dem Proteinmolekül durch die Salzsäure herausgeschält werden,“ [1]) und demzufolge als Grundstock des ganzen komplizierten Eiweißmoleküls zu gelten haben; es bedarf einer energischen Zersetzung, um sie in ihre und damit in die letzten Spaltungsprodukte des Eiweißes zu zerlegen.

---

[1]) Siegfried, Über Kaseinokyrin, Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 67.

Vorstehende Arbeit wurde in der Chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig ausgeführt.

Es sei mir vergönnt, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. M. Siegfried,

für die Anregung zu der Arbeit, sowie für die mir stets liebenswürdigst gewährte Belehrung und Unterstützung bei derselben meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Hugo Kirbach, evang.-luther. Konfession, wurde geboren am 18. Februar 1876 zu Desterro in Brasilien. Nachdem meine Eltern nach Deutschland übergesiedelt waren, besuchte ich 2 Jahre lang in Dresden und dann bis zu meiner Konfirmation in Hainichen die Bürgerschule. Ostern 1890 trat ich als Schüler in das Königl. Lehrerseminar zu Nossen ein und bestand Ostern 1896 daselbst meine Reifeprüfung. Ostern 1896—1899 amtierte ich als Hilfslehrer an der Bürgerschule zu Meißen und bestand während dieser Zeit die Wahlfähigkeitsprüfung am Seminar zu Nossen (November 1898) und die Maturitätsprüfung am Wettiner Gymnasium zu Dresden. Seit 1899 studiere ich an der Universität Leipzig Naturwissenschaften; nebenbei bin ich an verschiedenen höheren Lehranstalten als Lehrer für Naturwissenschaften tätig gewesen. Vorlesungen hörte ich bei den Herren Professoren: Beckmann, Hausdorff, Hölder, Kowalewski, Neumann, Pfeffer, Rassow, Siegfried, Wiener, Wundt, Zirkel.

Allen meinen akademischen Lehrern bin ich zu dauerndem Danke verpflichtet.